

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 理 学 )	氏名	Soumya Sethi
論文題目	DNA based Photo-controllable Extracellular Matrix-like Scaffolds to Understand and Control Cell Behaviour (DNAを用いた光制御細胞外マトリックス様足場による細胞行動の理解と制御)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>細胞外マトリックス (ECM) は、細胞の物理的な足場として機能するだけでなく、形態形成、分化、移動などの多くの細胞機能発揮のために重要である。ECMは特徴的な細胞成分で構成されており、細胞に動的で可逆的に調節されている。ECMを模倣した細胞材料は、細胞の効率よい培養など再生医療にとっても重要な素材である。本研究ではアゾベンゼンを含む光スイッチをもつDNAを用いて、光照射で長さを調節可能なDNAを基盤としたECMを新たに開発した。これらの光照射により制御可能なDNAを基盤としたECMは、光照射に忠実に応答するため、細胞の挙動をコントロールするのに役立つ大きな可能性がある。今回、申請者はDNAナノテクノロジーを使用して、1) リガンド間隔 (細胞接着ペプチド距離) を可逆的に制御するDNAポリマー、2) マトリックス剛性の変化を可逆的に制御する3次元DNAナノチューブ、の2つの異なるタイプのECMを設計した。これらのDNAを基盤とする2つのECMは、細胞形態を制御でき、細胞とECMとの相互作用について洞察を与え、光刺激に応答する新しい細胞培養の基質として使用できることが示された。</p> <p>1. 光制御可能な DNA を基盤とした ECM を利用した細胞形態の調節</p> <p>細胞外 ECM は、動的で可逆的な環境を提供する。細胞が形態形成、修復および分化を受けているとき、時空間での解像度の制御が必要となる。このような制御は、細胞プロセスをより良く理解するのに役立ち、試験管内での細胞機能の正確な操作を可能にする。ここでは、アゾベンゼンを含む光スイッチをもつ DNA を用いて、光照射により接着ペプチド間の空間距離を調節した。合成したアゾベンゼンを含む光スイッチをもつ DNA は、伸長した状態と収縮した 2 つの異なる構造を可逆的に形成することが AFM で確認された。そこで、HeLa とヒト間葉系幹細胞を使用して、RGD ペプチドで標識された光応答性 DNA ポリマーの効果を調べた。その結果、光照射によって可逆的に細胞の形態変化を引き起こすことを見出した。光制御可能な ECM は、細胞形態形成、組織修復、癌転移、細胞分化などの多くの重要な現象を理解するためのツールとして使用できる。さらに上記の現象は細胞間相互作用を考える上で重要な知見を与え、ECM の細胞に対する効果を理解する上で重要なツールとなることが示唆された。</p> <p>2. 細胞挙動の制御を目的とした剛性を調節可能な光制御 DNA ナノチューブ</p> <p>細胞の挙動は、リガンドの間隔、ECM の剛性などの細胞外環境によって決定される。2 番目の ECM の剛性の変化は、創傷治癒、腫瘍形成、発達などの多くの生物学的プロ</p>			

セスで起こることが指摘されている。ここでは、HeLa 細胞を用いて DNA ナノチューブの剛性の変化による細胞への効果を調べた。その結果 UV および VIS 照射によって剛性を変えた DNA ナノチューブは、HeLa 細胞の細胞形態を、多数の糸状仮足を伴う長い紡錘形の形態から、押し出しのような糸状仮足の量が少ないコンパクトな円形の形態に変化させることが示された。このような光制御できる ECM は、剛性のわずかな変化によって引き起こされるため、細胞と ECM との相互作用を知る上で重要な知見を与える。この光制御可能な可逆的 DNA ナノチューブで作られた ECM は、多くの疾患の病態生理学の初期段階を理解するのに役立つ可能性がある。

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

細胞外マトリックス(ECM)は細胞外にあるコラーゲンやプロテオグリカン、フィブロネクチン、ラミニンなどを主成分とする不溶性物質であり細胞の足場となり組織を形成するための構造体である。ECMは細胞の分化、移動、組織の機能発現に重要であり、組織培養や再生医療においても重要な成分である。一方、DNAナノテクノロジーは、DNAを使ってさまざまな形状とサイズのナノ構造を作成することができ、基礎研究から応用研究まで広範な分野で利用できる。近年、細胞制御と単一分子の観察は、DNAナノテクノロジーにおける重要な課題になっている。

本論文で申請者は、アゾベンゼンの光異性化によって距離や硬さを改変できるDNA構造体を設計し、細胞に対して光照射によって制御可能な細胞外マトリックスを構築した。申請者は、まず光異性化するアゾベンゼンを含んだDNAオリゴマーを合成し、それをローリングサークル増幅によって合成された長鎖DNAにハイブリダイズさせた。これらのDNA構造体の設計は、光照射によってアゾベンゼン部分が1本鎖となってヘアピン構造を形成してDNAが縮むという一連の動作原理を基盤としている。実際に、紫外光照射によるポリマーの縮小、可視光照射による伸長、明確に距離変化が原子間力顕微鏡によって確認された。この光機能性DNAにRGDペプチドを導入し、これを細胞培養皿上に固定して、その上でHeLa細胞間葉系幹細胞を培養した。その培養皿上の細胞に紫外光を照射すると形態変化が観察され、次いで、可視光を照射すると細胞の形態は元に戻ることが観察された。この紫外光-可視光間の形態変化は、繰り返し観察することが可能であった。

次に、申請者は三次元DNAナノチューブに同様の光制御部分を導入し、紫外光により柔らかくなり、可視光で硬くなるポリマーを合成した。実際に、三次元DNAナノチューブ内にRGDペプチドを導入し、これを細胞培養皿上に固定して、その上でHeLa細胞を培養した。その細胞に対して紫外光を照射すると、糸状仮足が消失する形態変化がみられた。また、可視光照射により元に戻った。本実験結果によって、光によるDNAナノチューブの硬さによるECMの制御が可能であることが示された。

以上、光照射によって制御可能な細胞外マトリックスの構築は、細胞の分化、移動、組織の機能発現に応用でき、またそれらのメカニズムを考える上でも重要なツールとなる。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和4年1月18日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： 年 月 日以降